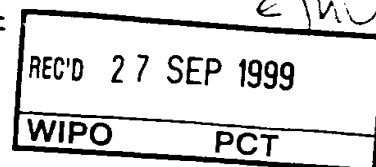


10.08.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/4332

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 8月10日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第236621号

出 願 人

Applicant (s):

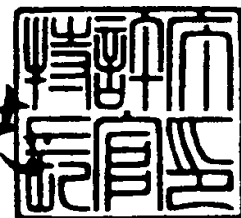
明治乳業株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 健 彦



出証番号 出証特平11-3059860

【書類名】 特許願

【整理番号】 P980012

【提出日】 平成10年 8月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 メチロトロフィック酵母における真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系

【請求項の数】 3

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

 【氏名】 村杉 章

【特許出願人】

 【識別番号】 000006138

 【住所又は居所】 東京都中央区京橋2丁目3番6号

 【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

 【代表者】 中山 悠

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メチロトロフィック酵母における真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) プロモーター配列、(b) サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の α 因子のシグナル配列、(c) MKファミリータンパク質をコードする遺伝子、(d) ピキア・パストリス由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) の転写終結配列、(e) 大腸菌及びメチロトロフィック酵母 (methylophilic yeast) で機能する選択マーカ遺伝子、(f) 大腸菌で機能する複製開始点、及び(g) メチロトロフィック酵母染色体DNAへの部位特異的相同組換えのための5' AOX1及び3' AOX1、からなるMKファミリータンパク質発現ベクターによって形質転換されたメチロトロフィック酵母による真正MKファミリータンパク質の分泌発現系。

【請求項2】 メチロトロフィック酵母がピキア・パストリスである請求項1に記載のMKファミリーの真正MKファミリータンパク質の分泌発現系。

【請求項3】 真正MKファミリータンパク質が真正MKタンパク質である請求項1または2に記載の真正MKファミリータンパク質の分泌発現系。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とした、組換えDNA技術による、真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系に関する。

【0002】

【従来の技術】

ミッドカイン (midkine; MK) は、レチノイン酸による胚性腫瘍細胞の分化誘導過程で早期に発現が誘導される遺伝子の産物として発見された (Kadomatsu, K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 1312-1318, 1988)。プレイオトロフィン (PTN) は、神経細胞突起伸長能をもつヘパリン結合タンパク

質として、新生ラットの脳に発見された (Rauvala, H.: EMBO J., 8: 2933-2941, 1989)。MKとPTNは、発生過程における細胞増殖、生存、及び分化を制御するヘパリン結合性のタンパクである (Tomomura, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770; Li, Y. et al.: Science 250: 1690-1694, 1990; Rauvala, H.: EMBO J., 8: 2933-2941, 1989; Wellstein, A. et al.: J. Biol. Chem., 267: 2582-2587, 1992)。成熟MK及びPTNは、塩基性アミノ酸とシステインに富む、それぞれ、121及び136アミノ酸からなるタンパク質で、およそ50%の相同性を持ち (Tomomura, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770; Kuo, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 18749-18752; Tsutsui, J. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 176: 792-797, 1991)、MKファミリーを形成する (Muramatsu, T.: Dev. Growth Differ., 36: 1-8, 1994)。

【0003】

MK及びPTNは、神経細胞の突起伸長を助ける作用を有することから、損傷神経細胞の修復又は治療に有用であるとする特許が出願 (特開平3-228656; 特開平6-253850) されており、最近、アポトーシス細胞死を抑制する作用を有するという新たな生物活性が見出されたことから、アポトーシス関連疾患の治療に有用であるとする特許が出願 (特願平10-210297) されている。

【0004】

このように、MKファミリーのタンパク質は、医薬品として、その有用性が期待されるので、これらのタンパク質を大量に発現する系の開発が望まれている。特に、天然由来のMKタンパク質 (真正; authentic) には、糖が付加されていないとされているので、このような真正MKタンパク質を組換えDNA技術で生産できれば、抗原性の問題等から、その有用性は計り知れないと考えられる。

【0005】

MK遺伝子の発現系としては、 β -アクチンとラウス肉腫ウイルスのプロモーター・エンハンサーの支配下で、MK-cDNAを、L細胞で分泌発現させた例 (Tomomura, M. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 171: 603-609, 1990)、E. coliで、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質としてMKを発現させ、融合部位をトロンピンで切断してMKタンパクを得た例 (Maruta,

H. et al.: Growth Factors, 8: 119-134, 1993)、昆虫細胞とバキュロウイルスを用いた発現系（特開平08-196293）、等が開示されている。しかしながら、これらの発現系のMKタンパク質の発現量は少なく（特開平08-196293の実施例7におけるMKタンパク質の発現量は2mg/L）、工業的レベルには達していない。

【0006】

ところで、酵母は、単細胞真核生物であり、分子生物学的知見が豊富であることや、安全性、培養の容易な点などから、組換えDNA技術により、有用なタンパク質を生産する際の宿主として利用されている。酵母の異種タンパク質（動物由来のタンパク質）発現系には、発現させたタンパク質を細胞内に蓄積させる細胞内発現系と、細胞外に分泌させる分泌発現系がある。しかし、細胞内発現系は、酵母の細胞表層が、細胞膜の外側に強固な細胞壁を有するため、発現されたタンパク質の精製が困難な場合が多い。一方、分泌発現系は、発現されたタンパク質が細胞外に放出されるため、連続培養が可能で大幅な生産量の増加が期待でき、さらに、細胞を破碎する手間がいらないので、精製はかなり容易となる。そこで、酵母を宿主とした、タンパク質の分泌発現が各方面で行われている。

【0007】

本発明者らは、これまで、ピキア・パストリスを宿主としたMKタンパク質の分泌発現生産を試みてきたが、その発現量は少なく（30～50mg/L）、また、その大部分は、真正MKタンパク質には存在しないと思われる糖が結合しており、そのため、真正MKタンパク質の分離・精製が困難となり、真正MKタンパク質の工業的生産の障害となっていた。

【0008】

そこで、本発明者らは、真正MKタンパク質の発現量の増加を目指して発現カセットのコピー数を増加させた発現株を多数作製して、発現を試みたが、MKタンパク質の発現の場合、コピー数はあまり関係ないようで、ファーメンターでの発現量が従来株の約2倍程度の細胞株は得られたものの、大幅な発現の増加が見られた株は得られなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明は、酵母を宿主とする組換えDNA技術において、真正MKタンパク質を大量に分泌生産することが可能な発現系を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、ピキア酵母のアルコールオキシダーゼのプロモーター支配下に、成熟MKタンパク質をコードするcDNAを、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の α 因子遺伝子のシグナル配列の直後に結合させメチロトロフィック酵母発現ベクターを構築し、これを用いてメチロトロフィック酵母を形質転換させたところ、得られた形質転換体が、培地中に、活性型の真正MKタンパク質を大量に分泌発現することを見出し、本発明を完成した。

【0011】

すなわち、本発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とした、組換えDNA技術による、MKファミリータンパク質の大量分泌発現系に関し、より具体的には、

(1) (a) ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) プロモーター配列、(b) サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の α 因子のシグナル配列、(c) MKファミリータンパク質をコードする遺伝子、(d) ピキア・パストリス由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) の転写終結配列、(e) 大腸菌及びメチロトロフィック酵母 (*methylophilic yeast*) で機能する選択マーカ遺伝子、(f) 大腸菌で機能する複製開始点、及び (g) メチロトロフィック酵母染色体DNAへの部位特異的相同組換えのための5' AOX1及び3' AOX1、からなるMKファミリータンパク質発現ベクターによって形質転換されたメチロトロフィック酵母による真正MKファミリータンパク質の分泌発現系、

(2) メチロトロフィック酵母がピキア・パストリスである(1)の真正MKファミリーのタンパク質の分泌発現系、

(3) 真正MKファミリータンパク質が真正MKタンパク質である(1)または(2)の発現系、

に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

一般に、分泌タンパク質は、そのN末端側にシグナル配列（プレ配列）と呼ばれる20～30アミノ酸からなる配列を有する前駆体として合成されるが、このシグナル配列とは別に、プロテアーゼなどの加水分解酵素、ホルモン、増殖因子などの多くは、成熟部分に隣接したプロ配列と呼ばれる余剰部分をもつ。このプロ配列の機能については、成熟タンパク部分のジスルフィド結合の正しい形成に必須であること（Weissman, J. S. & Kim, P. S.: Cell, 71: 841-851, 1992）、成熟タンパク部分の膜透過に関与すること（Wiren, K. M. et al.: J. Biol. Chem., 263: 19771-19777, 1988）、或いはプロ配列が成熟タンパク部分と相互作用し、活性のある正しい高次構造の形成を促進する機能をも有していること（Winther, J. L. & Sorensen, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88: 9330-9334, 1991）、など、いくつかのプロ配列の機能の解析例が報告されているが、まだ不明な点も多い。本発明においては、このプレプロ配列を含めて「シグナル配列」という。

【0013】

酵母の分泌タンパク質の中で、遺伝子の構造が明らかにされているものは、インベルターゼ（SUC2）、酸性ホスファターゼ（PHO5、PHO3）、 α -ガラクトシダーゼ（MEL1）、 α 因子（MF α 1、MF α 2）、a因子（MFa1、MFa2）、二重鎖RNAキラー毒素（KILM1）、線状DNAプラスミドのキラー毒素（KIL97、KIL28）などの遺伝子である。MF α 1、MF α 2、KILM1、KIL97は、プレプロ構造を有している。異種タンパク質の分泌生産に最もよく利用されているMF α 1のシグナル配列は、85～89アミノ酸残基からなる（J. Kurjian & I. Herskowitz: Cell, 36: 933, 1982）。

【0014】

MF α 1のシグナル配列（以下 α 因子シグナル配列という）は、これまでに、ヒトの上皮成長因子（Brake, A. J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 4642, 1984）、 β -エンドルフィン（Bitter, G. A. et al.: Proc. Natl. Acad.

. Sci. USA, 81: 5330, 1984)、インターフェロン α 1 (Singh, A. et al.: Nucleic Acids Res., 12: 8927, 1984)、 α Con 1 (Bitter, G. A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 5330, 1984)、マウス (Miyajima, A. ET AL.: Gene, 37: 155, 1986) とウシ (Price, V. et al.: Gene, 55: 287, 1987) のインターロイキン 2、カルシトニン (Zsebo, K. M. et al.: J. Biol. Chem., 261: 5858, 1986)、ウシのプロキモシン (Smith, R. A. et al.: Science, 229: 1219, 1985)、ソマトメジン C (J. F. Ernst: DNA, 5: 483, 1986)、ヒトインスリン (Thim, L. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 6766, 1986)、ネズミのグラニューロサイトマクロファージコロニー促進因子 (Price, V. et al.: Gene, 55: 287, 1987)、スロンビン阻害剤ヒルジン (Shaw, K.j. et al.: DNA, 7, 1988)、などのタンパク質の分泌生産に利用されている。

【0015】

異種タンパク質の分泌生産を飛躍的に高めるために、基本的には、分泌シグナルの直後に、タンパク質領域をコードするcDNA、またはイントロンを含まない遺伝子を、酵母で機能するプロモーターとターミネーターの間に挿入した発現ベクターが用いられる。分泌シグナルには、酵母自身の分泌タンパク質遺伝子のもつシグナルか、酵母以外の分泌シグナルを用いる。

【0016】

本発明の、MKファミリーのタンパク質の分泌生産に使用する発現ベクターの構築は、J.Sambrook, E.F.Fritsch, T.Maniatis ((1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA) に記載の標準的な方法を用いることができる。発現ベクターは、適切なメチロトロフィック酵母のベクターを使用する。本発明の実施に好適なベクターとは、ピキア (Pichia) 属及び最も好適には、ピキア・パストリスGS115 (寄託番号; NRRL Y-15851) にも適合するベクターである。最も好適な発現ベクターとして、例えば、図5に示す発現ベクターpPIC9 (Phillips Petroleum Company) を用いることができる。該ベクターは、大腸菌及びピキア・パストリスのそれぞれでの選択に必要な遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin) 及びピキア酵母ヒスチジノール脱水素酵素遺伝子 (HIS4)、

をもつシャトルベクターである。この発現ベクターは、大腸菌プラスミドpBR322由来の複製開始点 (ColE1)、異種遺伝子を発現させるためのピキア酵母アルコールオキシダーゼのプロモーター (5' AOX1)、サッカロミセス・セレビスエの α 因子分泌シグナルをコードするDNA (S)、AOX1遺伝子の転写終結配列 (3' AOX1-T)、及び5' AOX1と共にピキア・パストリス染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含んでいる。

【0017】

α 因子シグナル配列を利用する場合、異種遺伝子の挿入部位は、(1) 85番目のLysの後と、(2) 89番目のAlaの後の2例が報告されている (菱沼文夫：化学と生物、26: 568~576, 1988)。本発明では、 α 因子のプレプロ配列の最後のLys-Argに続くスパーサー配列Glu-Ala-Glu-Alaの直後に、或いはその後に位置するEcoRI部位に、MKファミリータンパク質をコードする遺伝子を挿入する。本発明は、MKファミリータンパク質自身のシグナル配列に換えて、図3に示す、サッカロミセス・セレビスエの α 因子シグナル配列を利用するのを特徴としている。

【0018】

MKファミリータンパク質の構造遺伝子は、本分野ではよく知られている。例えば、ヒトMK遺伝子は、Met (1-3のATG) から、Ala (64-66のGCC) に至る22個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、それに続くLys (67-69のAAA) からAsp (427-429のGAC) に至る121個のアミノ酸からなる成熟タンパク質をコードしている (配列番号：1の核酸配列及び配列番号：2のアミノ酸配列参照)。また、PTNタンパク質の遺伝子は、Met (1-3のATG) から、Ala (94-96のGCA) に至る32個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、それに続くGly (97-69のAAA) からAsp (502-504のGAT) に至る136個のアミノ酸からなる成熟タンパク質をコードしている (特開平6-253850の図1参照)。本発明は、ここに例示した遺伝子配列の使用に限定されない。MK或いはPTNタンパク質の生物学的機能を損なうことなく、これらの遺伝子配列の限定改変を行うことが可能である。生物学的機能の類似した、MK或いは、PTN遺伝子の修飾、例えば、欠失、挿入または置換などの修正も本発明に含まれる。

【0019】

MKファミリーのタンパク質をコードする遺伝子は、該遺伝子の増幅に適切なセンスPCRプライマー及びアンチセンスPCRプライマーを用い、該遺伝子を鋳型としてPCRを行い、遺伝子を増幅する。この場合、プライマーには、発現ベクターに含まれる適切な制限酵素認識部位を含ませる。次いで、該遺伝子を発現ベクターの適切な制限酵素切断部位に挿入する。MKファミリーの成熟タンパク質の遺伝子を含む発現ベクターで大腸菌HB101を形質転換する。形質転換した大腸菌クローンをいくつか選び、これに含まれる発現ベクターを鋳型とし、適当なプライマーを使用してPCRを行い、挿入遺伝子の向きが正しいことを確認する。この発現ベクターについて、MK遺伝子及び挿入部位付近の塩基配列を決定し、塩基配列に誤りのないことを確認する。

【0020】

形質転換のための酵母宿主は、適切なメチロトロフィック酵母すべてを含む。メチロトロフィック酵母は、ハンセヌラ (Hansenula)、カンジダ (Candida)、クロエケラ (Kloeckera)、ピキア、サッカロミセス、及びロドトルラ (Rhodotorula) からなる属から選択される、メタノール存在下で増殖可能な酵母を含むが、それに限定されない。好適には、栄養要求性ピキア・パストリス G115 (NRRL Y-15851) などのピキア属のメチロトロフィック酵母であり、さらに好適には、プロテアーゼ活性の低下しているメチロトロフィック酵母、例えば SMD1168 (Phillips Petroleum Company) である。MKファミリータンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターを導入するための形質転換法は、プロトプラスト法 (Hinen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929, 1978)、リチウム法 (Ito, H. et al.: J. Bacteriol., 153: 163, 1983)、電気パルス法 [D.M. Becker, L. Guarente, "Method in Enzymology", ed. by C. Guthrie, G. Fink, Vol. 194, p. 182, Academic Press, New York (1991)] などのうち、何れの方法でも実施可能であるが、例えば、電気パルス法を用いる場合は、Invitrogenのプロトコール (例えば、pPICZA α , B, C, Version A, 160410, 25-0150) を用いることができる。

【0021】

形質転換されたメチロトロフィック酵母は、栄養要求性酵母を形質転換後 (酵

母の栄養要求性に従って) 栄養素を含まない培地による選択と、新しい表現型 (“メタノール利用能+/-, Mut+/-”) を検出することによる単離、または、形質転換体に耐性遺伝子を含む場合は、酵母に対して毒性を有する抗生物質の存在下で培養することにより単離できるが、これらに限定されない。

【0022】

単離した形質転換メチロトロフィック酵母は、フラスコ振とう培養法、高密度発酵法のような適切な培養技術によって培養される。MKタンパク質の発現は、ベクターに含まれる発現調節領域に適合した方法により達成できる。メタノール応答性の調節領域(例えば、アルコール オキシダーゼのプロモーター) が用いられている場合は、発現の誘導は、メタノールの存在下形質転換酵母を培養することにより可能である(特開平7-111891及び特開平8-228779参照)。ヒトMKタンパク質のシグナル配列を使用した発現株(pHILD4-hMK/GS115)と α 因子のシグナル配列を含む発現株(pPIC9K-4AhMK/GS115)のファーメンター培養を比較すると、図6に示すように、ヒトMKタンパク質のシグナル配列を含む発現株の場合、発現量が30-50mg/L ($1.8 \text{ A}_{280}=1\text{mg/ml}$ として計算)であるのに対して、 α 因子を含む発現株の場合には、約200mg/Lであり、さらに、培地にEDTAを加えると、約240mg/Lの発現量となっている。すなわち、 α 因子のシグナル配列を使用した方が、ヒトMK自身のシグナル配列を使用した場合よりも5倍程度の発現量が得られることが明らかである。

【0023】

本発明で得られるMKタンパク質を質量分析により解析した。図9に示すように、MKタンパク自身のシグナル配列を含む発現ベクターを使用すると、糖鎖の結合したMKタンパクが得られるが、 α 因子のシグナル配列を使用すると、図8に示すように、糖の結合が認められない真正なMKタンパク質が得られることが明らかである。

【0024】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0025】

〔実施例1〕 MKタンパク質発現ベクターの構築

ピキア酵母酸性ホスファターゼ (PHO1) 及びサッカロミセス セレビシエの α フェロモン遺伝子 (MF α 1) の分泌シグナル (以下、 α 1因子シグナル配列という) を使用した。

【0026】

発現ベクターの構築は、例えばJ.Sambrook, E.F.Fritsch, T.Maniatis (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA) により記載されたような標準的な方法を用いて行った。

【0027】

(1) MK自身のシグナル配列を含む発現ベクター

ヒトMK自身のシグナル配列を含む発現ベクターpHILD4-hMKの構築は、特開平9-95454号公報の実施例1に記載の方法で行った。

【0028】

(2) PHO1のシグナル配列及び α 1因子シグナル配列を含む発現ベクターの構築

PHO1のシグナル配列 (図1) を含む発現ベクターpHILS1 (図2) 及びMF α 1因子シグナル配列 (図3) を含む発現ベクターpPIC9K (図4) を使用した。発現ベクターpHIL-S1は、アルコール オキシダーゼのプロモーター、PHO1のシグナル配列及び該配列中におけるマルチクロニング部位、選択マーカーとしてHIS遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子等を含み、発現ベクターpPIC9Kは、これらに加えて、G418による多コピー選択用のカナマイシン耐性遺伝子を含む。

【0029】

これらのベクターに挿入するMK cDNAは、ヒト成熟MKタンパク質をコードするcDNA (配列番号: 1) を鋳型とし、制限酵素EcoRI認識部位を含むセンスPCRプライマー (配列番号: 3) 及びアンチセンスPCRプライマー (配列番号: 4) を用いてPCR反応を行い作製した。

【0030】

MK cDNAは、制限酵素EcoRIにより完全消化し、ホスファターゼで脱リン酸された発現ベクターpHIL-S1、或いはpPIC9KのEcoRI部位に挿入し、対応するMKタンパク発現ベクターpHILS1-3AhMK (PHO1のシグナル配列を含む) 及びpPIC9K-4AhMK ($\alpha 1$ 因子シグナル配列を含む) を得た。これらの発現ベクターで大腸菌HB101を形質転換した。形質転換した大腸菌クローンをいくつか選び、これに含まれる発現ベクターを鋳型とし、適当なプライマーを使用してPCRを行い、挿入cDNAの方向が正しいことを確認した。これらの発現ベクターについてMK cDNAおよび挿入部位付近の塩基配列を決定し、塩基配列に誤りのないことを確認した。発現ベクターpHILS1-3AhMKの場合は、正常にプロセスされたとしても3個の余分なアミノ酸が成熟MKタンパク質のアミノ末端に結合することになり、pPIC9K-4AhMKの場合は、正常にプロセスされても4個の余分なアミノ酸が結合することになる。

【0031】

(3) 真正MKタンパク質発現ベクターの構築

MF $\alpha 1$ の分泌シグナルを含む発現ベクターpPIC9 (図5) を使用した。pPIC9に挿入するMK cDNAは、センスPCRプライマー (配列番号: 5) 及びアンチセンスPCRプライマー (配列番号: 4) を用いて(1)と同様にして作製した。

【0032】

制限酵素EcoRIおよびXhoIにより完全消化されたMK cDNAは、同様に消化され、ホスファターゼで脱リン酸された発現ベクター pPIC9に連結し、真正MKタンパク発現ベクターpPIC9DP-hMKを得た。その後は、(1)と同様に、挿入cDNAの方向、MK cDNAおよび挿入部位付近の塩基配列に誤りのないことを確認した。

【0033】

[実施例2] MKタンパク質発現ベクターによるピキア酵母の形質転換

ピキア酵母GS115、及びSMD1168へのMKタンパク質発現ベクターの導入は、Invitrogenの電気穿孔法のプロトコール (例えば、pPICZA α , B, C, Version A, 160410, 25-0150) に準じて行った。SMD1168は、プロテアーゼ活性が低いpep4⁻株である。

【0034】

実施例1で得られたMKタンパク発現ベクターpHILD4-hMK (MK自身のシグナル配列を含む)、pHILS1-3AhMK (PHO1のシグナル配列を含む)、pPIC9K-4AhMK (α 1因子シグナル配列を含む)及びpPIC9DP-hMK (α 因子シグナル配列を含む)は、制限酵素SacIまたはBglIIIで完全消化した。初期対数増殖期のGS115、或いはSMD1168を蒸留水及び1Mソルビトールで洗浄後、1Mソルビトールに懸濁し、発現ベクターを加えた。Bio-RadのGenePulserを用い、1.5kV、25 μ F、200-400オームの条件で電気穿孔法を行った。形質転換体は、Hisの非要求性でまず選択し、必要であればさらにG418耐性による選択を行った。このようにして、ヒトMKの分泌シグナルを含む発現ベクターpHILD4-hMK、PHO1の分泌シグナルを含む発現ベクターpHILS1-3AhMK、及びMF α 1の分泌シグナルを含む発現ベクターpPIC9K-4AhMK、pPIC9DP-hMKのそれぞれで形質転換された発現株pHILD4-hMK/GS115、pHILS1-3AhMK/GS115、pPIC9K-AhMK/GS115、或いはpPIC9DP-4hMK/SMD1168を得た。

【0035】

〔実施例3〕 MKタンパク質発現株の試験管またはフラスコ培養

培地はファーメンター用完全合成培地を使用し、グリセリンを炭素源として1日培養した。1度菌体を遠心して沈殿させ、1%メタノールを含んだ新しい培地に懸濁し、MKタンパクの発現を誘導した。1%メタノールは毎日添加し、その際にpHを5または3に調製した。発現誘導は3日間行った。発現量はEIAで測定した。

【0036】

(1) 分泌シグナルによる発現量の違いについて

発現株pHILD4-hMK/GS115、pHILS1-3AhMK/GS115、或いはpPIC9K-4AhMK/GS115の試験管培養におけるMKタンパクの培養上清中への発現量を調べた。pHILS1-3AhMK/GS115の場合、MKタンパクの発現量は極めて少なく、多いものでも0.1mg/L程度であった。発現株pHILD4-hMK/GS115の場合、発現量の多いものでは2~3mg/Lの分泌が認められた。これに対して、発現株pPIC9K-4AhMK/GS115の場合には、発現量の多いものでは10mg/Lに達した。すなわち、 α 因子のシグナル配列を用い

ると、MKタンパク自身のシグナル配列を用いた場合の3～5倍程度のMKタンパク質の発現量が得られることが明らかである。

【0037】

(2) 発現時のpHによる発現物の違いについて

発現株pPIC9K-4AhMK/GS115を用いて、発現時のpHを3および5に調整した発現を行った。培養上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分析した。ゲルプレートは第一化学薬品（株）のマルチゲル10/20を使用した。発現3日目のMKタンパク質は、2本のバンドとして認められ、pH5では、分子量の小さい下のバンドが主となるが、pH3では分子量の大きい上のバンドが主となっている。これは、pH3では、pH5よりもMKタンパク質の分解が少ないことを示唆している。

【0038】

(3) 宿主の種類による発現物の違いについて

発現株pPIC9K-4AhMK/GS115、及びpPIC9DP-hMK/SMD1168におけるMKタンパクの発現を調べた。3日間発現後の培養上清のSDS-PAGEでは、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合には、明らかにMKタンパクが2本に見えるが、pPIC9DP-hMK/SMD1168の場合には、1本に見える。プロテアーゼ活性の低い細胞株SMD1168を宿主とした発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168の場合には、発現タンパク質の分解が抑えられていることを示唆している。

【0039】

【実施例4】 MK発現株のファーメンター培養

発現株pHILD4-hMK/GS115及びpPIC9K-4AhMK/GS115のファーメンター培養を、基本的にはJ.J.Clareら（（1991）BIO/TECHNOLOGY, Vol.9, 455-460）の方法に従って行った。発現4日目では、pHILD4-hMK/GS115の場合、発現量が30～50mg/L（ $1.8 A_{280} = 1\text{mg/ml}$ として計算）であるのに対して、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合には、約200mg/Lであり、さらに培地にEDTAを加えると約240mg/Lと増加した（図8）。すなわち、ファーメンター培養の場合も、試験管培養の場合と同様に、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を用いると、MKタンパク自身のシグナル配列を用いた場合よりもMKタンパクの発現量が増加し、5～8倍程度のMKタンパク質の発現量

となっている(図6)。また、培養上清中のSDS-PAGE及びウエスタンブロットによる分析結果から、培養上清中の主たるタンパク質は、分泌発現したヒトMKであることが明らかである。

【0040】

〔実施例5〕 精製MKタンパク質の解析

pPIC9K-4AhMK/ GS115のファーマンター培養上清から、SP-セファロースおよびヘパリンセファロースを用いて発現したヒトMKを精製した。

【0041】

培養上清10mlを取り、等量の蒸留水を加えて希釈した。pHをアンモニアで5に調製し、60mM酢酸緩衝液pH5.2で平衡化した約1mlのファルマシア社のストリームラインSPカラムにアプライし、吸着後0.5M NaClを加えた緩衝液で洗い、その後2M NaClを含んだ緩衝液でMKタンパクを溶出した。溶出物を50mM Tris-Cl pH7.5の緩衝液に透析した。透析物を上記透析に使用した緩衝液で平衡化したファルマシア社のストリームラインヘパリン約0.5mlのカラムにアプライし、0.5M NaClを含んだ上記緩衝液でカラムを洗浄後、2M NaClを含んだ上記緩衝液でMKタンパクを溶出した。溶出物を蒸留水に透析して精製MKタンパク質を得た。

【0042】

精製MKタンパクの質量分析は、MALDI法(matrix-assisted laser desorption ionization/ time-of-flight mass spectrometer)により行った。使用した分析器は、PerSeptive BiosystemsのVOYAGER ELITEである。マトリックスとしてはSinapinic acid(アセトニトリル/水/TFA=33/67/0.1中)(10mg/ml)を用いた。乾燥サンプルを30 μ lの水に溶解し、マトリックス溶液を9倍量加えた溶液を1 μ lサンプルプレートにアプライし使用した。キャリブレーションはUbiquitin(+1):8565.89(average)とMyoglobin(+1):16952.56(average)を標準タンパク質として行った。

【0043】

アミノ末端アミノ酸配列の分析は、エドマン法により決定した。使用したプロテインシーケンサーは、島津製作所のPPSQ21である。

【0044】

精製MKの質量分析では、予想発現物の他にアミノ末端から、Tyr-Val-Glu-Ph

e-Lysの5アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lysの7アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lys-Asp-Lys-Val-Lys-Lysの12アミノ酸が除かれたものが観察された(図7)。また、発現物のアミノ末端分析の結果、Tyr、Lys、Aspが検出され、これらは予想発現物MKタンパク質、アミノ末端から5アミノ酸除かれたもの、および7アミノ酸が除かれたもののアミノ末端のアミノ酸と一致する。しかし、糖の結合したMKの明らかなシグナルは観察されない。これらの結果から、MKに糖の結合が少ないことが明らかである。

【0045】

すなわち、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を使用すると、MK自身のシグナル配列を使用する場合と比較して、MKタンパク質の発現量が増大するだけでなく、真正なMKタンパク質には結合していないと思われる糖の結合も著明に減少することがことが明らかである。

【0046】

[実施例6] 真正MKタンパク質の解析

実施例2で得られた発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168をファーマンター培養した。基本的には実施例4に記載の方法に従ったが、グリセリンによる細胞増殖を $A_{600}=100$ 程度までにし、その後メタノール流加を開始し、細胞増殖と発現誘導を同時に行った。発現時の温度は 20°C 、pHは3であった。発現誘導は9日間行った。最も発現量の多いと思われた7日目の培養液10mlからMKタンパク質を、上記と同様にして、SP-セファロース及びヘパリンセファロースを使用して精製した。精製途中で失われた量を考慮に入れず、最終的に得られたMKタンパクの量から発現量を計算すると約 170mg/L となった($1.8A_{280}=1\text{mg/ml}$ として)。したがって、実際の発現量は、これより多いことは明らかである。

【0047】

発現産物のMKタンパクを、標準物質である化学合成の成熟MKタンパク質(ペプチド研究所)と、還元SDS-PAGE、非還元SDS-PAGE、及びNative-PAGE(native-PAGEは、Davisの方法に従って行ったが、目的タンパク質の等電点が高いため、泳動槽の電極の結合を逆にした)を行って比較したが、分子量などの違いは認められなかった。アミノ末端のアミノ酸配列は、表1に示す真正MKタンパクの

アミノ末端のアミノ酸配列に一致した。質量分析の結果は、予想値とほぼ同じ13241.9(+1の値、理論値+1は13241.3)であり(図8)、宿主をGS115からSMD1168に変更するととも培養条件を変えたために、分解物の量はごく僅かとなった。分解物の中で最も多いものは(測定値12258.3)、成熟MKタンパク質のアミノ末端からLys-Lys-Lys-Asp-Lys-Val-Lys-Lysの8アミノ酸が除かれた分子種であると考えられる。また、糖の結合したMKによるシグナルも認められなかった。比較のために、MK自身のシグナル配列を含む発現株(pHIL4-hMK/GS115)を培養し、発現されたMKを精製して質量分析した結果を図9に示す。真正MKのピークは最も高い(測定値13241.6)が、糖が一個から18個結合していると考えられるMKのピークが観察される。真正MKより質量数の少ないものは部分的に分解されたMKであろう。糖の結合していない真正MKはある割合でしか得られず、また、糖の結合のみが異なる分子種が多数含まれるため真正MKの精製も困難である。以上のことから、ここで得られたMKタンパク質は、糖の結合がない真正な成熟MKタンパク質がほとんどであると考えらる。また、発現量も今まで使用していた株に比べると格段に多い。したがって、この発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168をMKタンパク質の分泌生産に使用すれば、生産量は比較的容易に増大させることが可能である。

【0048】

【表1】

分析サイクル	アミノ酸の種類	アミノ酸量 (pmol)
1	Lys	114
2	Lys	119
3	Lys	132
4	Asp	109
5	Lys	125
6	Val	137
7	Lys	123
8	Lys	121
9	Gly	94
10	Gly	94

【0049】

【発明の効果】

本発明により、真正MKファミリータンパク質を工業的レベルで大量に分泌発現することが可能となった。

【0050】

【図面の簡単な説明】

【図1】

ピキア酵母酸性ホスファターゼ分泌シグナル部分の塩基配列を示す図である。
Vは、シグナルペプチドの切断部位を示す。

【図2】

MKタンパク質発現ベクターpPHIL-S1の構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター (5' AOX1)、ピキア酵母酸性ホスファターゼ (PH01) のシグナル配列 (S)、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列 (3' AOX1-TT) 及び5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後にマルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、pBR322由来ColE及びバクテリオファージ f1を含み、選択マーカとして、アンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin) 及びピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (HIS4) を含む。

【図3】

サッカロミセス・セレビスエ由来の α 因子分泌シグナル部分の塩基配列を示す図である。(1)は、プレ配列の切断部位を、(2)は、プレプロ配列の切断部位を、(3)は、ジペプチジルアミノペプチダーゼによる切断部位を示す。

【図4】

MKタンパク質発現ベクターのpPIC9K構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター(5' AOX1)、サッカロミセス・セレビスエ由来の α 因子のシグナル配列(S)、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列(3' AOX1-TT)及び5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後にマルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、pBR322由来ColE1を含み、選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子(Ampicillin)、ピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(HIS4)及びカナマイシン耐性遺伝子(Kanamycin)を含む。

【図5】

MKタンパク質発現ベクターpPIC9の構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター(5' AOX1)、サッカロミセス・セレビスエ由来の α 因子のシグナル配列(S)、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列(3' AOX1-TT)及び5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後にマルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、pBR322由来ColE1を含み、選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子(Ampicillin)及びピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(HIS4)を含む。

【図6】

MKタンパク質発現株pPIC9K-4AhMK/GS115(サッカロミセス・セレビスエ由来の α 1因子のシグナル配列を含む)の5mM EDTA存在下、EDTA非存在下におけるファーマンター培養、及びpHIL4-hMK/GS115(MKタンパク質自身のシグナル配列を含む)のファーマンター培養における培養上清中のMKタンパク質の発現量を示すグラフである。

【図 7】

MK タンパク質発現株 pPIC9K-4AhMK/GS115 (サッカロミセス・セレビシエ由来の α 1 因子のシグナル配列を含む) の培養上清中から精製した MK タンパク質の質量分析結果を示す図である。

【図 8】

同じく、真正 MK タンパク質発現株 pPIC9DP-hMK/SMD1168 (サッカロミセス・セレビシエ由来の α 1 因子のシグナル配列を含む) の培養上清中から精製した MK タンパク質の質量分析結果を示す図である。

【図 9】

同じく、MK タンパク質発現株 pHILD4-hMK/GS115 (MK タンパク質自身のシグナル配列を含む) の培養上清中から精製した MK タンパク質の質量分析結果を示す図である。

【配列表】

<110> Meiji Milk Prod co ltd

<120> Production of Midkine family proteins in methylotrophic yeast cells

<130> P980012

<141> 1998-08-10

<160> 5

<210> 1

<211> 562

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

```

atgcagcacc gaggtttcct cctcctcacc ctccctgccc tgctggcgct cacctccgcg   60
gtcgccaaaa agaaagataa ggtgaagaag ggcgggcccg ggagcgagtg cgctgagtgg  120
gcctggggggc cctgcacccc cagcagcaag gattgcggcg tgggtttccg cgagggcacc  180
tgcggggccc agaccagcg catccggtgc aggggtgccct gcaactggaa gaaggagttt  240
ggagccgact gcaagtacaa gtttgagaac tggggtgcgt gtgatggggg cacaggcacc  300
aaagtccgcc aaggcaccct gaagaaggcg cgctacaatg ctcagtgccg ggagaccatc  360
cgcgtcacca agccctgcac cccaagacc aaagcaaagg ccaaagccaa gaaagggaag  420
ggaaaggact agacgccaag cctggatgcc aaggagcccc tgggtgcaca tggggcctgg  480
cccacgccct ccctctccca ggcccagat gtgaccacc agtgccttct gtctgctcgt  540
tagctttaat caatcatgcc cc                                         562
    
```

<210> 2

<211> 143

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met	Gln	His	Arg	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ser	Ala	Val	Ala	Lys	Lys	Lys	Asp	Lys	Val	Lys	Lys	Gly	Gly
			20					25						30	
Pro	Gly	Ser	Glu	Cys	Ala	Glu	Trp	Ala	Trp	Gly	Pro	Cys	Thr	Pro	Ser
			35					40						45	
Ser	Lys	Asp	Cys	Gly	Val	Gly	Phe	Arg	Glu	Gly	Thr	Cys	Gly	Ala	Gln
			50					55						60	
Thr	Gln	Arg	Ile	Arg	Cys	Arg	Val	Pro	Cys	Asn	Trp	Lys	Lys	Glu	Phe
			65					70						75	
Gly	Ala	Asp	Cys	Lys	Tyr	Lys	Phe	Glu	Asn	Trp	Gly	Ala	Cys	Asp	Gly
					85					90					95
Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Arg	Gln	Gly	Thr	Leu	Lys	Lys	Ala	Arg	Tyr
					100					105					110
Asn	Ala	Gln	Cys	Gln	Glu	Thr	Ile	Arg	Val	Thr	Lys	Pro	Cys	Thr	Pro
					115					120					125
Lys	Thr	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys	Lys	Gly	Lys	Gly	Lys	Asp	
					130					135					140

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

gcgcccgaat tcaaaaagaa agataaggtg aagaaggcg gcccgggg 48

<210> 4

<211> 46

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

gcgcccgaat tcttagtcct ttcccttccc tttcttggct ttggcc 46

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

gcgcccctcg agaaaagaga ggctgaagct aaaaagaaag ataaggtaga gaagggcggc 60

【書類名】

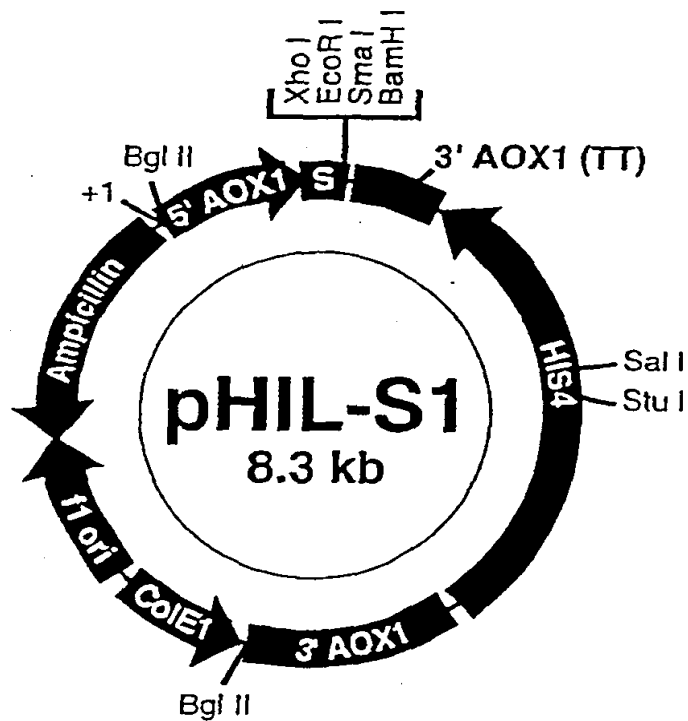
図面

【図 1】

```

<----- 5'AOX1----->-PHO1 signal sequence-----
.....TTATTCGAAACG/ATG TTC TCT CCA ATT TTG TCC TTG GAA ATT ATT TTA GCT
TTG GCT ACT TTG CAA TCT GTC TTC GCTVCGA GAA TTC CCC GGG ATC CTT AGA CAT
--PHO1 signal sequence----->v<--Multi cloning site-----><-3'AOX1--
    
```

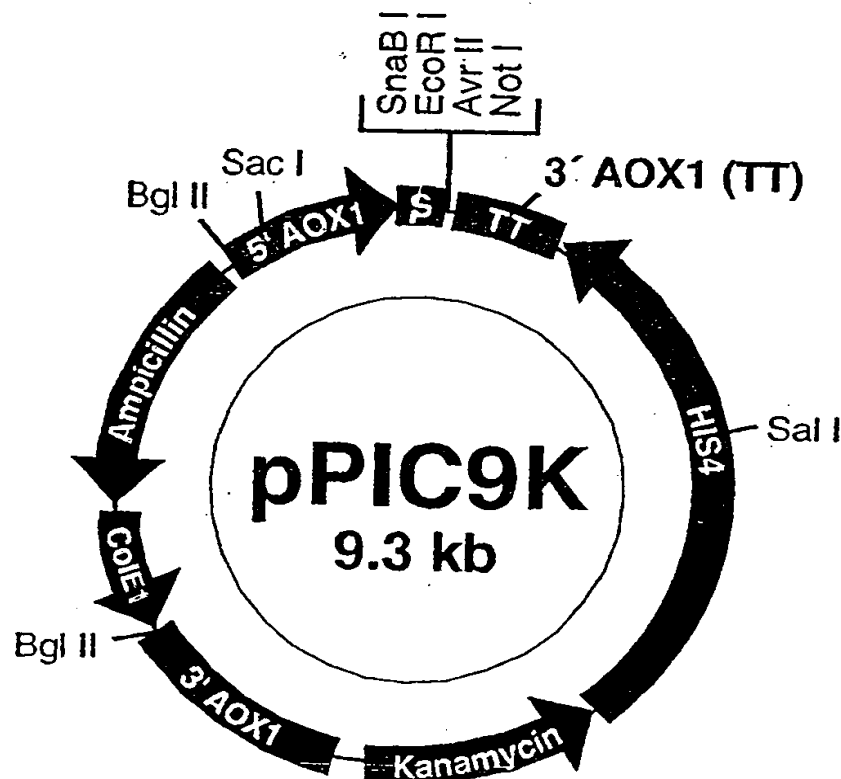
【図 2】



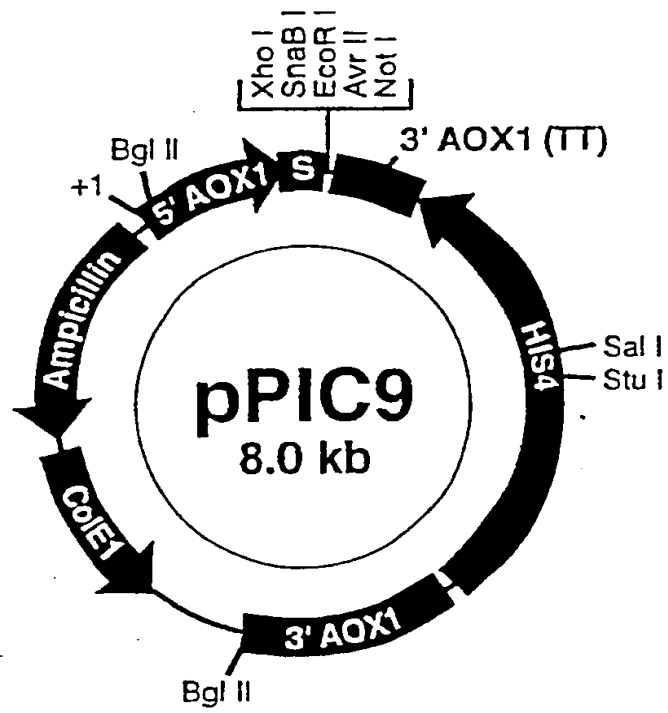
【図 3】

.....5'AOX1...TTCGAAGGATCCAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val
 (1)
 TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA
 Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Arg Ile Thr Thr Glu Asp Glu
 ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
 Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn
 (2)
 ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA GAG
 Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg Glu
 (3) Hind III
 GCT GAA GCT TAC GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG ...
 Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala

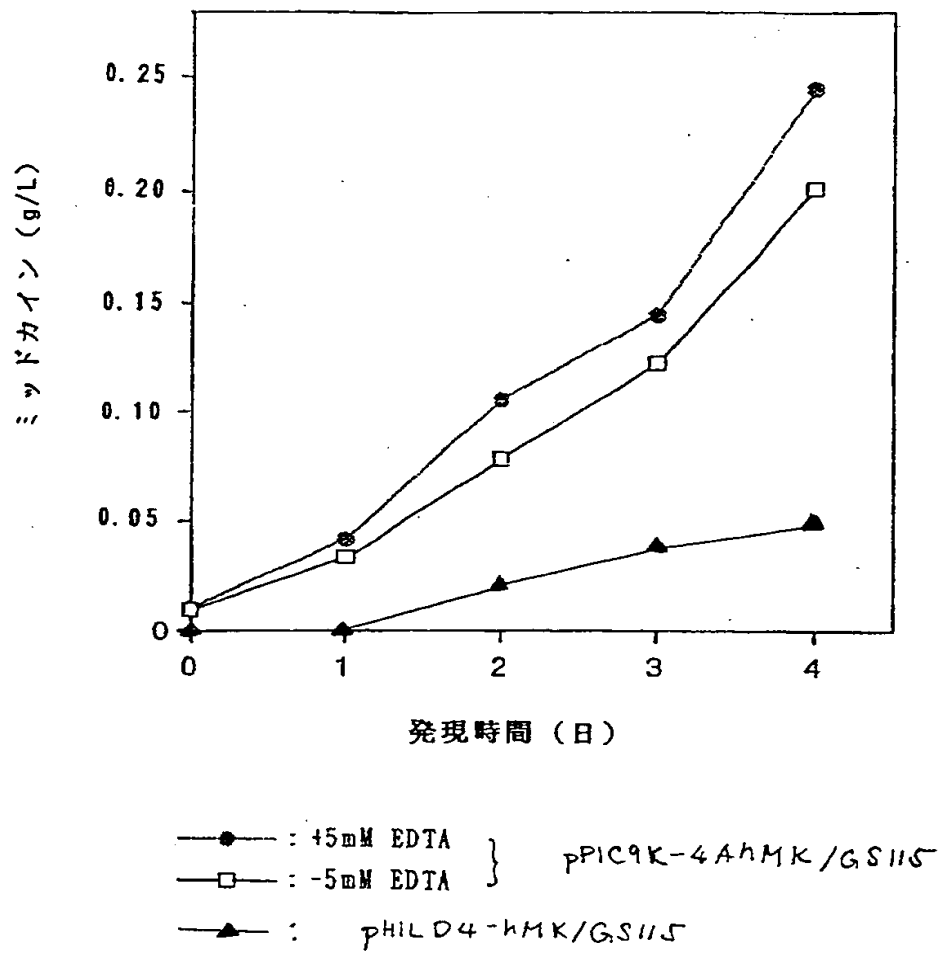
【図 4】



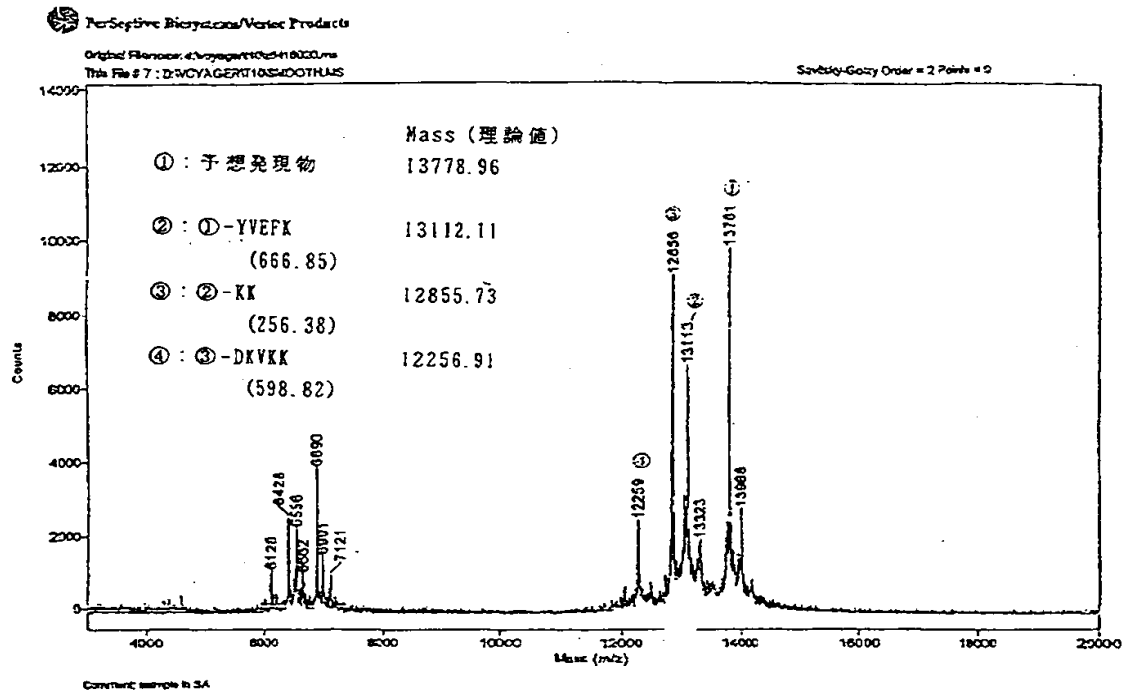
【図 5】



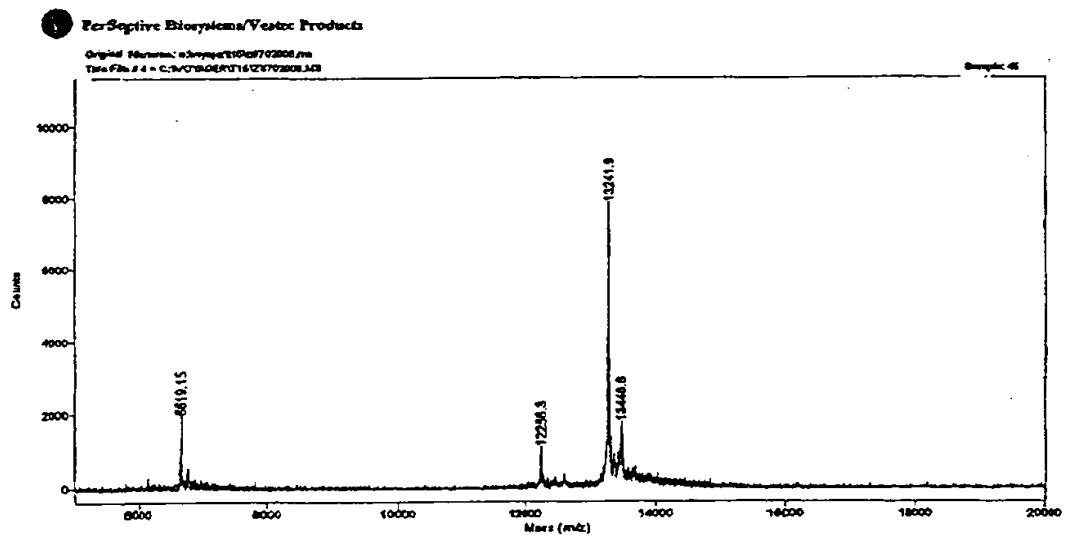
【図6】



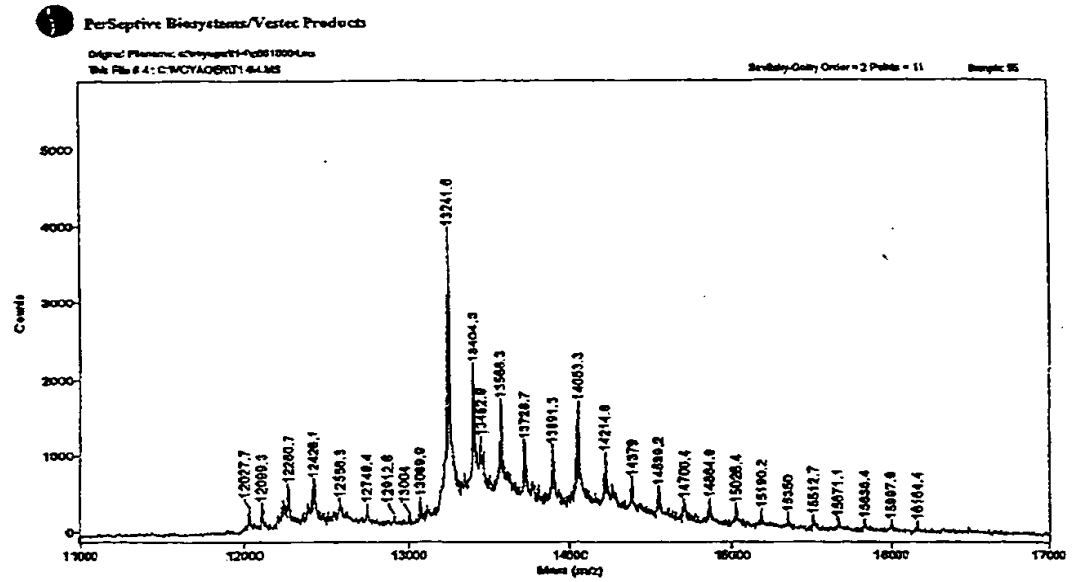
【図7】



【図8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とする、真正MKタンパク質の大量分泌発現系を提供することを課題とする。

【解決手段】

ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) プロモーター及び転写終結配列の支配下に、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来の α 因子のシグナル配列を連結したMKタンパク質遺伝子を含む発現ベクターにより形質転換されたピキを培養して、培養上清中に真正MKタンパク質を大量に分泌発現させる。

【選択図】 図6

【書類名】	職権訂正データ
【訂正書類】	特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000006138
【住所又は居所】	東京都中央区京橋2丁目3番6号
【氏名又は名称】	明治乳業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006138]

1. 変更年月日 1990年 8月14日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区京橋2丁目3番6号
氏 名 明治乳業株式会社

